

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

2

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 2002017391 A

(43) Date of publication of application: 22.01.02

(51) Int. Cl

C12P 19/12
C12N 9/10
// C12N 15/09
(C12N 9/10, C12R 1:06), (C12N 9/10, C12R 1:19), (C12N 15/09, C12R 1:06)

(21) Application number: 2000205772

(22) Date of filing: 06.07.00

(71) Applicant:

NIPPON BEET SUGAR MFG CO LTD JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP

(72) Inventor:

**KIKUCHI HIROTO
SAKURAI HIROAKI
SAYAMA KOJI
ARITSUKA TSUTOMU
TOMITA FUSAO
ASANO KOZO
YOKOTA ATSUSHI**

(54) METHOD FOR MASS PRODUCTION OF DIFRUCTOSE DIANHYDRIDE IV

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing difuructose dianhydride IV (DFA IV) by applying an LFTase gene which is a new gene prepared based on a new design and is mass producable the DFA IV that is a functional oligo saccharide, efficiently, since it highly expresses a highly active enzyme, to levan which can be efficiently produced in a large

amount by culturing bacteria belonging to the genus *Serratia* (*Serratia levanicum*) on a sucrose-containing medium, and then possible to produce the DFA IV through a route of sucrose to levan and to DFA IV in a continuous process.

SOLUTION: This method for producing the DFA IV is to apply the new LFTase to the level for producing the DFA IV efficiently in the large amount.

COPYRIGHT: (C)2002,JPO

(51) Int.Cl.⁷
 C 12 P 19/12
 C 12 N 9/10
 // C 12 N 15/09
 (C 12 N 9/10
 C 12 R 1:06)

識別記号

F I
 C 12 P 19/12
 C 12 N 9/10
 (C 12 N 9/10
 C 12 R 1:06)
 (C 12 N 9/10

テマコード(参考)

4 B 0 2 4
 4 B 0 5 0
 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 9 ○ L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2000-205772(P2000-205772)

(71)出願人 000231981

日本甜菜製糖株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番13号

(22)出願日 平成12年7月6日(2000.7.6)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 菊地 裕人

北海道帯広市稲田町南9線西13番地 日本
甜菜製糖株式会社総合研究所内

(74)代理人 100075775

弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ジフルクトース・ジアンヒドリドIVの大量製造法

(57)【要約】

【解決手段】新規レパンフルクトトランスフェラーゼ(LFTase)をレパンに作用させて、ジフルクトース・ジアンヒドリドIV(DFA-IV)を効率的に大量生産する。

【効果】LFTase遺伝子は新たな設計に基づいて作成された新規遺伝子であって、活性の高い酵素を高発現するため、機能性オリゴ糖であるDFA-IVを効率的に大量生産できる。また、一方のレパンも、セラチア属菌(*Serratia levanicum*)を蔗糖含有培地で培養することにより、効率的に大量生産できる。そのうえ、本発明によれば、蔗糖→レパン→DFA-IVの生成を連続工程で実施することも可能である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有するレバンフルクトトランスフェラーゼ (LFTase) をレバンに作用させてジフルクトース・ジアンヒドリドIV (DFA IV) を製造すること、を特徴とするDFA IVの製造方法。

(1) 作用

β -2, 6 フラクトシド結合を有する、ポリフラクタンのレバンを分解し、ジフルクトース・ジアンヒドリドIV (DFA IV) を合成する作用を有する。

(2) 基質特異性

レバン及び鎖長が3から7のレバンオリゴ糖に作用する。

(3) 至適pH及び安定pH範囲

至適pH: 6.0

安定pH範囲: 4.0 ~ 12.0

(4) 至適温度及び安定温度範囲

至適温度: 50°C

安定温度範囲: 本酵素は、40°Cまで安定であった。

(5) 分子量

分子量: 約50,000Da (SDS-PAGE、ゲル温度7.5%)

(6) 酵素の誘導性

本酵素の誘導発現にはレバンを要しない。

【請求項2】 配列番号1のアミノ酸配列で示されるLFTaseをレバンに作用させてDFA IVを製造すること、を特徴とするDFA IVの製造方法。

【請求項3】 配列番号2の塩基配列で示されるLFTase遺伝子に対応するアミノ酸配列を有するLFTaseをレバンに作用させてDFA IVを製造すること、を特徴とするDFA IVの製造方法。

【請求項4】 配列番号2の塩基配列で示されるLFTase遺伝子のDNAを含有するプラスミドで形質転換してなる形質転換体を培養し、得られた培養物由来のLFTaseを使用すること、を特徴とする請求項1に記載のDFA IVの製造方法。

【請求項5】 形質転換体としてエシエリヒア・コリ (Escherichia coli) BL21 (DE3) - pET/LTFSa (FERM P-17896) を使用すること、を特徴とする請求項4に記載のDFA IVの製造方法。

【請求項6】 酵素反応液中の糖を資化及び/又は除去する処理、脱塩処理、クロマトグラフィー分離処理の少なくともひとつの処理によりDFA IV画分を精製、回収すること、を特徴とする請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 イーストで通気培養処理することにより酵素反応液中の糖を資化及び/又は除去すること、を特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】 強塩基性イオン交換樹脂及び強酸性イオ

ン交換樹脂、又は、強塩基性イオン交換樹脂を用いて脱塩処理すること、を特徴とする請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】 クロマトグラフィー分離の担体として、Na型またはCa型の強酸性イオン交換樹脂を使用すること、を特徴とする請求項6~8のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ジフルクトース・ジアンヒドリドIV (以下、DFA IVといふこともある) の製造方法に関するものであり、更に詳細には、新規レバンフルクトトランスフェラーゼを用いることによりレバンからDFA IVを効率的に大量製造する新規にして有用な方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 DFA IVは、6, 2' : 2, 6' 型のフラクトシド結合を有する難消化性の二糖類であつて、低カロリーで且つフルクトース系の冷涼感のある甘味を有し、またカルシウム吸収促進作用も有する等、甘味料のほか機能性食品としても有用であることが確認されているが、更に新たに有用な用途の開発も期待され、その量産が希求されている。そして、DFA IVは、レバンにレバンフルクトトランスフェラーゼ (以下、LFTaseといふこともある) を作用させて製造されているが、レバン及びLFTaseのいずれについても、生産量が不足しており、十分に満足できる効率的な製造方法は未だ開発されていないのが現状であり、DFA IVの量産のため、高純度のレバン及び高純度のLFTaseを大量に工業生産する方法の確率が強く要望されている。また、効率的なDFA IVの回収、分離精製法の開発も希求されている。

【0003】 レバンに作用させてDFA IVを製造するのにLFTaseは、アルスロバクター・ニコチノボランスGS-9株 (Arthrobacter nicotinovorans GS-9 (以下、GS-9菌といふこともある) を培養中、培地中のレバンにより誘導発現される誘導酵素である。しかしながら、この酵素の発現量は微量であつて、工業的応用は困難であるし、更にLFTase酵素溶液の生産にはレバンを必須とするため、工程が複雑となり、工業生産上大きな障害となつてゐるだけでなく、現時点においては、レバン自体の工業的大量生産が確立されておらず、この方法によるLFTase生産性の低下は否めない。

【0004】 また、上記したような天然型LFTaseの製造のほかに、遺伝子組換え型LFTaseの製造についても検討された。すなわち、GS-9由来のLFTase遺伝子がSaito et al. (Biosci. Biotech. Biochem., 1997, 61(12), 2076-2079)によつてクローニングされており、その1次配列が解明されると

ともに、pUCプラスミドベクター系を利用し、大腸菌を宿主とした発現系が構築されている。しかしながら、その発現量は充分に満足できるものとはいはず、未だ改良の余地が残されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記した技術の現状に鑑み、上記した欠点を解決して、高純度DFA-IVを効率的に製造する方法を新たに開発する目的でなされたものであって、新規LFTaseの開発、DFA-IV製造法自体の効率化、その効率的精製工程の開発を目的としてなされたものである。また、DFA-IVは、レバパンをLFTaseで処理することによって製造することができるものであるが、その原料ないし基質であるレバパン自体について、その効率的大量製法が確立していないため、DFA-IVの効率的大量製法を確立するには、レバパンの量産も必要であるし、蔗糖の新規用途の開発が待望されている製糖業界にあっては、蔗糖を利用するレバパンの大量製造法が開発されればなおさら好都合である。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記目的を達成するためになされたものであって、微生物工学、遺伝子工学、クロマトグラフィー論等すべての面から検討した結果、活性の高い新規組換えLFTase、これを使用するDFA-IVの効率的製造方法及び精製方法を新たに開発するに至り、遂に本発明の完成に至った。

【0007】また、原料として用いるレバパンについても、その効率的大量生産方法を新たに開発するのに成功しただけでなく、蔗糖を用いる新規なレバパンの製造方法を新たに開発するのに成功し、しかも全く予期せざることに、レバパンを生成した後、培養液からレバパンを単離することなく、次のLFTase処理に移行することができ、引き続いて、粗DFA-IVの精製、単離、結晶化ができるというきわめて有用な知見が得られ、蔗糖を原料とし、途中で中断することなく連続して高純度DFA-IVを大量に製造することにもはじめて成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】このように、一連の工程で、しかも複数の微生物、酵素を使用するとともに各種の複雑な処理を行うにもかかわらず、相互の干渉をひき起すことなく、反応がスムーズに進行し、高純度DFA-IVがきわめて効率的に大量生産できることは、まさに驚異的なことである。

【0009】以下、本発明を、蔗糖を出発原料として一連の操作によりDFA-IVを製造する方法を例にとって説明するが(図8)、一連の操作の途中で反応生成物を一部取り出し、これを用いて次の反応を行なう断続操作も可能であるし、例えば市販されているレバパンを用い、これにLFTaseを作用させてDFA-IVを製造することも、もちろん可能である。以下、本発明を、連続

処理を例にとり、このフローにしたがって説明する。

【0010】レバパンは、 β -2, 6結合型のポリフラクトン(フルクトフラノースの β -2, 6結合による連鎖からなる多糖類)であって、試薬や代用血液に添加するといった医薬的用途のほか、フルクトースの連鎖からなる多糖類であることから、飲食品の分野においても有効利用が期待されている。そして、レバパンは、*Bacillus subtilis*, *Bacillus megatherium*, *Streptococcus salivarius*等の培養によって製造されているが、本発明は更に効率的な製法を開発したものである。

【0011】すなわち本発明は、セラチア属に属するレバパン生成菌を砂糖含有液中で培養することにより、レバパンを生成することによりレバパンの効率的に製造するものである。

【0012】本発明においては、セラチア属に属するレバパン生成菌であればすべての微生物が使用でき、その1例としてセラチア・レバニカム(*Serratia levanicum*) (以下、セラチア菌といふこともある)が例示される。そして更にセラチア菌の中から好適株をスクリーニングするのに成功し、その内の1株を*Serratiale vanicum* NN株と命名し(以下、セラチアNN菌といふこともある)、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17895として寄託した。

【0013】本発明を実施するには、蔗糖とセラチア菌とを接触させる必要があり、例えば、1~35%砂糖含有液中でセラチア菌を培養すればよい。本発明におけるセラチア菌の培養は、培地に砂糖を含有せしめた点を除き、常法にしたがって行なうことができ、常用される炭素源、窒素源、ミネラル等に蔗糖を加え、セラチア菌の培養に適したpH(6~7.5)、温度(25~35℃)に調整して培養すればよい。蔗糖の含有量は、培地1L当たり、10~400g、好適には100~300g、更に好適には150~250gとするが、上記範囲よりも少なくても、培養時間を延長すればよく、上記範囲のみに限定されるものではない。

【0014】このようにして本発明者らは、セラチア菌を蔗糖含有培養液中で培養することによりレバパンが生成するので、これを分離、採取することによってレバパンを製造する方法を開発するのにはじめて成功した。そして更に特徴的なことに、本発明者らが開発したセラチア属に属する細菌によって生成するレバパンは、他の微生物によって生成するレバパンに比較して、 β -2, 1結合が少ない直鎖型のレバパンである。そのため、セラチア属に属する細菌によって生成するレバパンは、オリゴ糖製造原料として適しており、高収率でオリゴ糖を得ることができるとても優れている。したがって、この方法で得たレバパンを使用すれば、オリゴ糖の一種であるDFA-IVを製造する本発明にあっては、その製造効率を更に高めることができるという著効が奏される。そして、本発明者らは、これに満足することなく、更にレバパンの生成効率

を高めるために研究を行った結果、前培養法及び冷却熟成法を新たに開発し、これらの方の少なくともひとつを上記した蔗糖含有培地を用いる方法と結合したところ、レバンの生成効率を大幅に高めることにも成功した。本発明は、これらも包含するものである。

【0015】前培養法は、蔗糖含有培地で行う培養法（本培養法ということもある）に先立ち、セラチア菌を少量の培地で培養するものであって、場合によっては蔗糖を添加してもよいが、通常は蔗糖を添加しない培地（本培養法で使用する培地と同じ組成のものでもよいし、相違するものであってもよい）で培養するものである。一定期間（10～30時間程度）培養した後、菌体を分離又は分離することなく培養物（菌体+培地）全体をそのまま本培養液に接種する。蔗糖含有液で前培養した場合、培養物中にはレバンが既に生成している場合もある。

【0016】冷却熟成法は、本培養終了後ないし一定期間経過後、低下したpHを上げるとともに低温に維持する方法であって、本発明者らが創製した方法であって、これを冷却熟成法と新たに命名したものである。本培養の終了は、レバン生成量がピークに達したときとするが、レバン生成量はこれを実際の測定により求めることは当然のことであるが、培養液の粘度測定によって求めてもよいし、及び／又は、pHを測定してpHが3.5～5.3付近にまで低下したときとしてもよい。また、本培養は、通常、5～20時間経過後に終了する場合が多いので、培養時間で本培養の終了を決定してもよいし、上記培養時間を目安として、レバン生成量、粘度、pHの少なくともひとつを測定して、培養終了時を決定してもよい。

【0017】このようにして培養を中止ないし終了した後、低下したpHを上げ（pH4.5～7.0）、低温（20℃以下、好ましくは15℃以下、更に好ましくは1～10℃）に維持する。その期間は、上記と同様にしてレバンの生成量を測定してピークになったときまでとすればよく、通常3日～10日以上であるが、1週間～2週間程度が一応の目安となる。

【0018】このようにして冷却熟成した後は、常法にしたがってレバンを回収すればよく、例えば、培養物の固液分離を行い（濾過、遠心分離、デカントーション等常法による）、得られた培養液に40～100%、好ましくは50～70%アルコールを加えてレバンを沈澱せしめて、レバンを白色沈澱として得る。そして必要あれば、これを乾燥して白色無定形粉末状のレバンを得る。アルコールとしては、メタノール、プロパノール、イソプロパノール、エタノール、ブタノール、sec（又はtert）ブタノール、アミルアルコール、イソアミルアルコール、アリルアルコール等の脂肪族の飽和又は不飽和アルコールその他各種アルコールが1種又は2種以上併用できる。沈澱したレバンは、これを分離し、通風

乾燥、減圧乾燥、デシケーター乾燥その他の方法で乾燥する。

【0019】このようにして一旦単離した精製レバンを用いて、これを緩衝液に再溶解し得られた溶液にLFTase（又は酵素液）を添加し、レバンを分解してDFA-IVを合成することができるが、本発明においては、レバンを単離することなく、例えば冷却熟成後、溶液の温度を30～40℃に調節し、50～200rpmで攪拌しながら、pHを5～7に調整し、LFTase（又はその酵素溶液）を添加して、例えば12～36時間合成反応を行い、レバンからDFA-IVを製造してもよい。

【0020】次に、DFA-IV合成反応に使用するLFTaseについて述べる。本発明においては、前記したような欠点を有しない、活性の高いすぐれたLFTaseを使用する必要があるため、各方面から検討の結果、遺伝子工学的手法に着目し、更に発現効率を高めるためにシステムの設計を行うこととした。

【0021】すなわち本発明者らは、Saitoらが構築するのに成功したLFTase遺伝子の発現系を大幅に改良して発現効率を高めるため、そしてそれと同時に従来未知の新規にして活性の高い酵素を新規に開発するため、LFTase遺伝子のオープンリーディングフレーム（以下、ORFということもある）のみの新規作成を試み、各種設計の結果、遂にORFの塩基配列の決定に成功した。そして、PCR法によってそのORFの作成を行うこととし、それを実施するため、検討の結果、センスプライマー及びアンチセンスプライマーの塩基配列の決定及びそれらの人工合成を試みそれらにも成功した。そしてGS-9の染色体DNAを録型としてPCRを行うことにより、ORFのみの調製に成功した。

【0022】これを、pET系プラスミドベクター、例えばpET-3aプラスミドベクターのマルチクローニングサイトに連結して、新たな発現プラスミドpET/LFTsaを構築した。ORFの切り出しへ、LFTase遺伝子の開始および終止コドン部に、部位特異的の変換法で制限酵素NdeIおよびBamHI部位を作製することで行い、特にORFのフレームを合わせた。このプラスミドベクターには大腸菌中で外来遺伝子として連結された遺伝子を効率的に転写、翻訳できる、T7lacプロモーターが導入されており、Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside（IPTGということもある）により高発現が可能となり、簡易的な操作で部分精製が行えるように工夫した。

【0023】このプラスミドベクターを大腸菌BL21（DE3）株に形質転換した形質転換体をEscherichia coli BL21（DE3）-pET/LFTsaと命名し、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-17896として寄託した。このよ

うにして創製した形質転換体は、非常に高いLFTase活性を取得しており、本発明によれば、元株(GS-9菌)の5~50倍、Saitoらが構築するのに成功した、DNA分子pBB-1を導入した大腸菌JM109株(大腸菌JM109/pLFT-BBI:特開平11-69978、FERM P-16316)の2~20倍もの高活性を取得できるようになり、更にスクリーニングすれば、これら以上の数十倍の活性を取得することも可能である。また、本発明によれば、酵素製造に従来必要であったレバンが不要になるという著効が得られることが確認された。

【0024】このようにして創製した形質転換体を培養することにより、LFTaseの大量発現が可能となった。なお、本形質転換体は、LFTaseを菌体内に生産したため、培養終了後、菌体を破碎し、上清を無細胞抽出液とし、この無細胞抽出液から酵素精製の常法にしたがい、透析、クロマト処理、濃縮、限外濾過処理等を適宜組み合わせて行い、精製酵素を得る。

【0025】本発明に係るLFTaseは、遺伝子設計によりきわめて緻密な計算の結果、人工的に創製されたものであって、下記する理化学的性質を有する新規酵素であり、しかもその活性はきわめて高く、その生成にレバンの存在を必須とする誘導酵素ではない等すぐれた効果も有するものである。このようにして調製したLFTaseは、これをレバンに作用させることにより、DFA-IVを効率的に製造することができる。その際LFTaseは、単離精製したもののはか、部分精製したもの、あるいは上記した無細胞抽出液(又はその濃縮液)を使用することもできる。

【0026】(1) 作用

本酵素は、 β -2, 6 フラクトシド結合を有する、ポリフラクタンのレバンを分解し、DFA-IVを合成する作用を有する。

【0027】(2) 力値の測定法

本酵素活性は、Saitoら(Saito et al. ; Biosci. Biotech. Biochem., 1997, 61(12), 2076-2079)の方法に準じて行った。0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)中で、終濃度が10g/Lとなる様にレバンを溶解させた基質溶液に、酵素溶液を混合して、37℃で10分間反応した。その後、反応溶液を沸騰水中で5分間保持することで反応停止とした。生成したDFA-IVをHPLCにより定量し、活性値を算出した。ここで、酵素1単位は、本酵素反応条件下で、1分間当たりに1 μ molの反応生成物を生じる酵素量とした。

【0028】(3) 基質特異性

本酵素の触媒可能な糖質関連物質を調査した。その結果、本酵素は、レバンと、鎖長が3から7のレバンオリゴ糖に作用することが判明した。その他の各種糖質には作用しなかった。

【0029】(4) 至適pH及び安定pH範囲

本酵素のpHに対する影響を調査した。安定性の検討は、酵素溶液を各pHの緩衝液中で24時間、4℃で保持した後、溶液をpH 6.0の緩衝液で置換し、定法に従い酵素活性を測定した。その結果、本酵素の至適pHは6.0であり、pH 4.0から12.0の幅広い範囲で安定であった。

【0030】(5) 至適温度及び安定温度範囲

本酵素の温度に対する影響を調査した。安定性の検討は、酵素溶液を各温度で20分間保持した後、素早く4℃に冷却し、定法に従い酵素活性を測定した。その結果、至適温度は50℃であり、40℃まで安定であった。

【0031】(6) pH、温度等による失活の条件

(4) 及び(5)に記載のpH及び温度の条件、特に安定性において、相対活性が低下している範囲以上が失活の条件であると考察される。また、酵素溶液を沸騰水中に5分間保持した後の酵素活性消失は確認している。

【0032】(7) 阻害、活性化及び安定化

Hg²⁺イオン、およびAg²⁺イオン存在下で、著しく活性が阻害された。

【0033】(8) 精製方法

形質転換大腸菌の無細胞抽出液を調製した後、DEAE-Toyopearl 1650M(東ソ社製)陰イオン交換樹脂などで、効率的に部分精製できる。

【0034】(9) 分子量及び分子量の測定方法

LFTaseタンパク質の分子量測定は、タンパク質の精製純度検定と同時に、Laemmli(Laemmli: Nature(London), 1970, 227, 680-685)の方法に従いSDS-PAGEにより行った。ゲルの濃度は7.5%とした。タンパク質の染色はCoomassie Brilliant Blueを用いた。その結果、分子量は、およそ50,000Daと測定された。この値は、遺伝子のDNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列から算出される分子量53,153Daと類似しており、信頼性がある。

【0035】(10) 反応生成物の同定

本酵素により生産されたオリゴ糖を精製後、C¹³-NMRにより、スペクトル分析をした。その結果、反応生成物は、DFA-IVと同定された。

【0036】(11) 酵素の誘導性

本酵素の誘導発現にはレバンを要しない。

【0037】本発明に係る新規酵素は、上記した理化学的性質を有する酵素であればすべてのものが含まれ、例えば配列番号1のアミノ酸配列(図1)で示されるタンパク質もその1例として例示される。その製造方法にしても、その遺伝子(その塩基配列を配列番号2、図2に示す)を含有した新規形質転換体(FERM P-17896)を培養することにより本発明に係る新規酵素を得ることができるし、その新規アミノ酸配列の1例が明らかにされたので(配列番号1)、合成によっても本

酵素を得ることができる。

【0038】このようにして調製した新規LFTaseは、それ自体又は酵素溶液（例えば、前記した無細胞抽出液）を、前記した冷却熟成後のレバーン溶液（pH5～6.5付近に調整）に添加して、レバーンを分解してDFA-IVを合成せしめる。

【0039】DFA-IVを結晶化するためにはその含有量を高める必要がある。まず、DFA-IV含有液に含有される糖を資化又は／及び除去し、可能な限り少なくし、DFA-IVの含有率を高める。次に、そのDFA-IV含有液を脱塩するために、強塩基性イオン交換樹脂及び強酸性イオン交換樹脂、又は、強塩基性イオン交換樹脂を用いて、それぞれ充填したカラムに通液する。その流出液を集めて濃縮した液を、塩型陽イオン交換樹脂のクロマト塔に通液し、流出するDFA-IV画分をクロマトフラフィーで分離、採取し、純度の高いDFA-IV液を得る。そして、このDFA-IV画分を濃縮し、それを煎糖または冷却すればDFA-IVの結晶を析出させることができ、DFA-IV結晶を製造することができる。DFA-IVを効率的に結晶化させるには、その純度（DFA-IV/固形分W/W%）を60%以上にする必要がある。

【0040】DFA-IV含有液中の糖の資化に用いられるイーストは*Saccharomyces cerevisiae*に属するものであれば良く、生イースト、乾燥イーストが利用される。イースト通気培養処理に供されるDFA-IV含有液の濃度は高ければ高いほど、後工程のクロマトグラフィー分離に供される原液の濃度が上がり、濃縮費用が少なくなるので好ましい。イーストを生産する場合には、通常、培養槽の濃度は固形分0.01W/W%度に保持されるが、本発明の場合、培養槽のDFA-IV含有液の濃度は固形分10から60W/W%の範囲でイースト処理されること、好ましくは、30～50W/W%が良く、イースト処理の差異の濃度を高くすることができる。

【0041】尚、DFA-IV含有液のイースト処理の温度は、30～37°Cで行われ、DFA-IV含有液へのイースト添加量とその処理時間は大略比例関係にあり、その添加量と処理時間は適宜選択されるものである。又、クロマトグラフィーの処理に使用する塩型陽イオン交換樹脂として、Na、K、Ca型の樹脂が用いられる。クロマト分離法としては、モノベット方式、疑似移動方式、前記の中間の方法等があるがいずれの方法でも使用することができる。

【0042】以上、これらの技術を駆使し、砂糖からのDFA-IV生産を効率・連続化した。砂糖1000グラムからおよそ150～200グラム以上の高純度（90%以上）のDFA-IV单一画分を製造することができるようになった。

【0043】なお、イースト処理後、所望するのであれ

ば、凝集剤（例えば、三菱化学製PAC）を添加した後、遠心分離処理等により菌体を回収した後、加熱処理し（80～100°C）、濃縮し、脱塩処理に移行してもよい。

【0044】以下、本発明の実施例について述べる。

【0045】

【実施例1】セラチアNN菌（FERM P-17895）を用いてレバーンの製造を行った。セラチア菌の培養は、Yokotaら（Yokota et al. : Biosci. Biotech. Biochem., 1993, 57, 745-749）、およびKojimaら（Kojima et al. : J. Ferment. Bioeng., 1993, 75, 9-12）の方法を参考に、これに改良を施した。以下、詳細を記述する。

【0046】前培養法 5.0g/L 酵母エキス、10.0g/L ポリペプトン、10.0g/L 塩化ナトリウム（pH7.0）の組成である培地（培地1ということがある）を、3L容三角フラスコに1L調製し、セラチア菌を1白金耳接種し、30°Cで、24時間、ロータリー一振とう培養した。

【0047】本培養法 200g/L 蔗糖、g/L 酵母エキス、8.5g/L ポリペプトン、0.3g/L グルコース（pH7.0）の組成である培地（培地2ということがある）を、200L容ステンレス製ジャーファメンター（日立製作所製、モデルF-02）に調製し、前培養したセラチア菌の培養液を全量接種した。培地2の酵母エキス、およびポリペプトン量は、半量にしても問題はない。そして、温度30°C、攪拌80rpm、通気1vvmで培養を行った。温度、pH、粘度を経時的に測定した。

【0048】培養終了と冷却熟成法 培養10時間後を目安とし、培養液粘度が最も増加して、pHが4.0付近まで低下した時に培養を中止し、pHを5.5に調整し、温度を4°Cに冷却した。この条件は1週間以上保持される様に制御した。

【0049】上記したように、培地1と培地2を用い、200L容のジャーファメンターでセラチア菌を培養し、レバーンを合成させた。その時の経過を図9に示した。10時間経過時にpHを調整し、冷却熟成すると、レバーン合成は減少することなく、増加した。レバーン合成と培地中の粘度には高い相関があり、レバーン合成の程度は粘度でモニターしている。フラスコ試験の粘度の最高値は30であるので、本実施例では40の値となり、十分に効率化できた。

【0050】65%エタノールでレバーンを沈澱せしめた。これを遠心分離処理してレバーンを分離、回収した。次いでこれを電気乾燥機中で50°Cに1時間乾燥せしめ、白色粉末状のレバーン60gを得た。

【0051】

【実施例2】(1) *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9株のレバーンフルクト

トランスクレーバー (LFTase) 遺伝子のオーブンリーディングフレーム (ORF) のみの調製
本明細書において多用する遺伝子組み換え操作実験の基礎技術は、斯界において公知のものであり、特に断らない限り Sambrook らの方法 (Sambrook et al. : モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリ・マニュアル、第2版、1989年) に従って行った。

【0052】LFTase 遺伝子の発現と活性に必要な部分のみを調製する目的で、遺伝子組み換えを行った。ここで指す「必要な部分のみ」とは、「成熟LFTase に相当する遺伝子のみ」という意味である。Saito (Saito et al. : Biosci. Biotech. Biochem., 1997, 61, 2076-2079) が解明した遺伝子情報を基に設計した。LFTase 遺伝子を含む遺伝子DNA の塩基配列を配列番号4 (図4) に示し (塩基配列91番目から塩基配列1644番目までがLFTase 遺伝子のORF) 、それから推定されるLFTase のアミノ酸配列を配列番号3 (図3) に示した。

【0053】まず設計は、配列表の配列番号4において、塩基配列1番目から90番目までと、LFTase の構造遺伝子の一部である塩基配列91番目から189番目までを除去する。塩基配列91番目から189番目までは、LFTase の最初のシグナルペプチド配列に相当するカ所 (アミノ酸配列1番目から33番目) で、除去されても成熟部が機能し、酵素活性には全く問題がない。そしてさらに、新たに開始コドンを付加する。また、開始コドンの直前、および終始コドンの直後で、遺伝子が任意に切断できる様に、塩基配列を強制的に置換して、適当な制限酵素部位を設定する。

【0054】実際には、塩基配列187番目から189番目に開始コドン配列 (atg) を付加し、直前を切断できる様に、制限酵素NdeI (catatg) 部位を、そして終始コドン部にBamHI (ggatcc) 部位を設計した。置換予定の塩基配列を含む20塩基ほどのプライマーを作製し、GS-9菌の染色体DNAを鋳型にPCR反応を行った。Taq ポリメラーゼは宝酒造製の標準品を用いた。PCR反応後、産物を回収・精製し、制限酵素NdeIとBamHIで処理後、適当なプラスミドベクターに連結し、塩基配列の置換具合をDNAシーケンスにより確認した。なお、LFTase の構造遺伝子中には、制限酵素NdeIとBamHI部位は存在しないので、途中で切断されない。

【0055】まとめると、置換された塩基は、次のようにになった。配列番号186番をcからTへ、配列番号187番をgからAへ、配列番号188番をcからTへ、配列番号189番をcからGへ。

【0056】配列番号1646番をcからGへ、配列番号1647番をcからAへ、配列番号1649番をgからCへ、変換した。配列番号2 (図2) に示すように、本発明で使用する重要な個所を切り出したものであつ

て、制限酵素NdeI (catatg) とBamHI (ggatcc) 部位を強制的に作り出した。あの配列 (ハイフン部) は、使用しない。

【0057】上記した設計の実施は、PCR法で行った。LFTaseのORFのみを調製するために、Saito (Saito et al. : Biosci. Biotech. Biochem., 1997, 61(12), 2076-2079) の解析したDNA塩基配列を参考にして、下記のDNA塩基配列を有する、27塩基の2種類の合成オリゴヌクレオチドプライマーを作製した。これらのプライマーは、DNA合成装置 (アプライド・バイオシステムズ社製) を用いて人工的に合成した。

【0058】増幅されたPCR産物 (LFTaseのORFのみを指す) の両端が、制限酵素処理で切断でき、プラスミドベクターに連結可能とするために、強制的に塩基配列を置換し、制限酵素部位を作製した。制限酵素部位も開始コドン側と終始コドン側が識別できる様に、NdeIとBamHIの2種類を設定した。センスプライマー、アンチセンスプライマーを配列番号5、6 (図5、6) に示し、図中、置換された塩基は下線表示した。

【0059】これとは別にSaitoの手法により調製したGS-9菌の染色体DNAと、上記2種類のプライマー、およびPCR反応用試薬とを混合し、PCR反応を行った。Taq DNAポリメラーゼは宝酒造製の標準品を用いた。PCR反応条件は、総液量が100マイクロリットル、サイクル数が35回、1サイクルが98℃の1分間、68℃の3分間とした。増幅されたLFTaseのORF断片、約1,500塩基対のDNA塩基配列、特に置換された部位のDNA塩基配列の確認は、シーケンスレベルで行った。得られたDNA塩基配列を配列番号2 (図2) に示す。

【0060】(2) LFTaseのORFとプラスミドベクターの連結

(1) のPCR反応液 (LFTaseのORF断片を含む) をエタノール沈殿法で回収・精製後、制限酵素NdeIとBamHIで2重消化した。これを更にエタノール沈殿法で回収・精製した。これとは別にpET-3aプラスミドベクター (宝酒造製) を制限酵素NdeIとBamHIで2重消化し、エタノール沈殿法で回収・精製したものを調製し、先に精製されたPCR産物とライゲーション反応により連結した。ここで作製されたプラスミドベクターを、pET/LFTsaと命名した (図7)。なお、従来のpLFT-BB1の構築も示した。

【0061】(3) プラスミドベクターpET/LFTsaの形質転換

(2) で作製した、プラスミドベクターpET/LFTsaはHanahan (D. Hanahan : Techniques for transformation of *E. coli*, in DNA Cloning: A Practical Approach, Vol.1, ed. by D. M. Glover, IRL Pre

13

ss, Oxford, 1985, 109-135) の手法に従い、ヒートショック法で、大腸菌BL21(DE3)株のコンピテント細胞(宝酒造製)に形質転換した。選択培地で培養し、単一化された遺伝子組換え大腸菌をEscherichia coli BL21(DE3)-pET/LFTsaと命名し、これを工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-17896として寄託した。

【0062】(4) Escherichia coli BL21(DE3)-pET/LFTsaによるLFTaseの生産
Escherichia coli BL21(DE3)-pET/LFTsa (FERM P-1789 10 6)を、100マイクログラム/m1のアンピシリンを含む5m1のLB培地で、対数増殖中期まで培養した(37℃)。この菌液0.2m1を、終濃度で1mMとなる様にIsopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)を含む100m1の同培地に接種し、37℃で24時間振とう培養した。培養後、大腸菌菌体を遠心分離し培養*

(表1)

表1：レバンフルクトトランスフェラーゼ活性の比較

株名	所在	LFTase活性 (U/m1培養液)
元株A. nolinovorans GS-9	菌体外	3.3
pLTF-BB1/大腸菌JM109	菌体内	17.6
pET/LFTsa/大腸菌BL-21(DE3)	菌体内	105.1

【0065】この無細胞抽出液から発現LFTaseの部分精製を行った。この無細胞抽出液を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)に対し一晩透析した。そして担体として緩衝液で平衡化したDEAE Bio-Gel A(バイオーラッド製)を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した。吸着したタンパク質の溶出は緩衝液中に含まれる塩化ナトリウム濃度を0-0.4Mまで直線的に変化させて行った。定法に従い、LFTase活性画分を測定し、活性画分を遠心限外ろ過膜で濃縮した。この粗酵素液を10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)に対し一晩透析した。この溶液を組み換え酵素の部分精製液とした。

【0066】

【実施例3】LFTaseを用いてレバンよりDFA IVを製造した。

【0067】(1) 先に製造したセラチア菌培養液の冷却熟成後の溶液を、アルコールによるレバン沈澱を行うことなく、37℃に調節し、100rpmで攪拌しながら、pHを6.0付近に調節した。このようにして得たレバン含有液200Lに、上記で調整したLFTase溶液(100U/m1)10m1を添加して、24時間、40℃でインキュベートし、レバンからのDFA IV合成反応を行った。

【0068】セラチア菌の培養液中からレバンを分離回

10

50

14

*上清とに分けた。菌体は10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で2回洗浄後、同緩衝液に再懸濁し、超音波破碎機で破碎した。破碎液を遠心分離し、この上清を無細胞抽出液とした。この溶液が、LFTase溶液である。

【0063】このようにして調製した大腸菌BL21(DE3)-pET/LFTsaの無細胞抽出液のLFTase活性を定法にしたがい測定したところ、105.1単位/m1であった。本発明によれば、元株(GS-9菌)の約30倍、Saitoらの系の約5倍と非常に高い生産性が得られた。なお、遺伝子組換え体は菌体内に酵素を生産したため(GS-9菌は菌体外に分泌発現)、酵素単位は培養液1m1当たりの数値に換算して比較した(表1)。

【0064】

収することは、レバンと培地中の余剰糖分、不純物、及び菌体とを分離するという意味、そして次反応のDFA IV合成反応時に至適緩衝液中にレバンを溶解できるという意味で重要であると考えられてきた。しかし、冷却熟成終了時に、酵素反応時の至適pHにpHを調整する操作のみで、その後の効率に何の問題も生じないことが明らかとなった。このことでエタノール沈澱によるレバンの回収が不要になり、エタノール沈澱に使用する資材と時間を大幅に省略することが可能となった。

【0069】また、この後の操作でイースト菌を添加して、余剰の糖分を除去する工程が存在するが(この操作を、イースト処理ということがある)、これも同タンク内で行なうことが可能であった。イーストで通気培養処理する酵素反応液の濃度は、1~40重量%、好ましくは5~30重量%であった。

【0070】(2) 上記により得られた酵素反応液(DFA IV 320gを含有)10Lにパン酵母(ニッテンイースト、商品名)300g(水分66%)を添加し、30℃で24時間通気培養した。その培養液を濾過した後、濃縮してBx50に調整した。内径12cm高さ79cmの樹脂製カラムにNa型とした強酸性陽イオン交換樹脂Amberlite CR-1310(商品名)7.6Lを充填し、これに前記濃縮液を0.02から0.10L/L-R/1サイクル、空間速度0.13

～0.53、温度80℃の条件で通液し、温水で押し出した。DFA-IV純度の高い画分を採取し、DFA-IV画分とした。この操作を10回実施して得られたDFA-IV画分を混合し、混合液0.6kgに活性炭を加えて脱色した。珪藻土濾過によって活性炭を除去し、ろ液を70℃で減圧濃縮した。その後、冷却結晶化(70→25℃)を行い、その結晶化物を遠心分離器で分離し、純度99.9%のDFA-IV結晶120gを得た。

【0071】(3)また、上記したイースト処理後の粗DFA-IV溶液を、図10に示した条件で、カチオン交換樹脂次いでアニオン交換樹脂に通液して、脱塩及びクロマトグラフィーの効果を生起させる処理を行なった。精製処理後のDFA-IV溶液のHPLCによる分析結果を図10に示した。なお対照として精製処理前の粗DFA-IV溶液のHPLCによる分析結果も図10に示した。その結果から明らかかなように、脱塩効果によって不純物を吸着除去できるとともに、クロマト効果によってDFA-IVと不純物(主に、図中、点線の右から1番目及び2番目のピーク)を分離できることがわかる。

【0072】その精製メカニズムは、現時点においては、次のとおりである。図11に示すように、カチオン交換樹脂を充填したカラムとアニオン交換樹脂を充填したカラムを直結し、そこに粗DFA-IV溶液を通液して脱塩している。本法によって粗DFA-IV溶液中のカチオンおよびアニオンが除去されるのは当然であるが、さらにアニオン交換樹脂によるクロマトグラフィー効果も大きく、高純度のDFA-IV溶液を得ることに成功している。(図11、図12)

【0073】アニオン交換樹脂から出てきた液を回収するタイミングを調整する(遅らせる)ことによって、図中AだけでなくB(イースト処理時に生成したグリセロールなど)も除去することが可能となる。本法を用いることによって、純度90%以上のDFA-IV溶液を回収率70～80%で得ることが可能である。

【0074】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 Nippon Tensaiseito Kabushiki Kaisha
 〈120〉 Production Method of DFA IV in Large Amount
 〈130〉 6337
 〈141〉 2000-7-6
 〈160〉 6
 〈210〉 1
 〈211〉 485
 〈212〉 PRT
 〈213〉 *Arthrobacter nicotinovorans*
 〈400〉 1

MET Gln Ala Ser Leu Arg Ala Ile Tyr His MET Thr Pro Pro Ser

【発明の効果】本発明に係る新規LFTaseをレバンに作用させることにより、効率的にDFA-IVを製造することが可能となった。また、その精製法も開発され、高純度のDFA-IVの製造が可能となった。

【0075】本発明に係るLFTaseは(同酵素遺伝子も同様)、従来未知の新規物質である。本酵素は、 β -2,6-ポリフラクタンを還元末端から二糖単位で切断する作用を有する。本酵素は非常に活性が高く、これをレバンに作用させることにより、各種機能性を有するDFA-IVを効率的に製造することができる。しかも本酵素は、遺伝子組換え型であり、活性が高いだけでなく、工業的に大量生産できるという特徴も有する。

【0076】また、本発明によって、セラチア属菌を使用する従来未知の新しいレバンの製造方法が開発され、効率的にレバンを製造することが可能となった。そのうえ、本発明によれば、更に、前培養法及び/又は冷却熟成法を新たに併用することにより、レバンの生成効率を更に大幅に高めることができはじめて可能となり、レバンの工業的製造にはじめて成功したものである。

【0077】このように、本発明によって、原料であるレバン及びLFTaseの大量生産が可能となったので、従来なし得なかったDFA-IVの大量生産がはじめて可能となり、そのうえ、その効率的精製法も開発されたので、高純度のDFA-IVを大量に製造することがはじめて可能となった。したがって、DFA-IVの機能性食品や医薬等への更なる工業的応用が可能となつた。

【0078】そのうえ、本発明は、蔗糖からDFA-IVの結晶化までの一連の工程を中断することなく連続して実施できるという画期的な特徴を有し、単離操作、他のタンクへの移送その他の作業が省略され、低コストでDFA-IVを製造することができるとともに、蔗糖の有効利用にも新たに途を拓くものであって、製糖業界に対して大きな貢献をなすものである。

【0079】

【配列表】

17

18

Gly Trp Leu Cys Asp Pro Gln Arg Pro Val His Thr Asn Gly Ala		
20	25	30
Tyr Gln Leu Tyr Tyr Leu His Ser Gly Gln Asn Asn Gly Pro Gly		
35	40	45
Gly Trp Asp His Ala Thr Thr Gly Asp Gly Val Ser Tyr Thr His		
50	55	60
His Gly Val Val MET Pro MET Gln Pro Asp Phe Pro Val Trp Ser		
65	70	75
Gly Ser Ala Val Val Asp Thr Ala Asn Thr Ala Gly Phe Gly Ala		
80	85	90
Gly Ala Val Ile Ala Leu Ala Thr Gln Pro Thr Asp Gly Lys Phe		
95	100	105
Gln Glu Gln Tyr Leu Tyr Trp Ser Thr Asp Gly Gly Tyr Ser Phe		
110	115	120
Thr Ala Leu Pro Asp Pro Val Ile Val Asn Thr Asp Gly Arg Thr		
125	130	135
Ala Thr Thr Pro Ala Glu Val Glu Asn Ala Glu Trp Phe Arg Asp		
140	145	150
Pro Lys Ile His Trp Asp Ala Thr Arg Asn Glu Trp Val Cys Val		
155	160	165
Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Ala Ala Phe Tyr Thr Ser Pro Asn Leu		
170	175	180
Arg Asp Trp Gln Trp Lys Ser Asn Phe Asp Tyr Pro Asn His Ala		
185	190	195
Leu Gly Gly Ile Glu Cys Pro Asp Leu Phe Glu MET Thr Ala Gly		
200	205	210
Asp Gly Thr Arg His Trp Val Phe Gly Ala Ser MET Asp Ala Tyr		
215	220	225
Ser Ile Gly Leu Pro MET Thr Phe Ala Tyr Trp Thr Gly Ser Trp		
230	235	240
Asn Gly Thr Ala Phe Ile Ala Asp Asn Leu Thr Pro Gln Trp Leu		
245	250	255
Asp Trp Gly Trp Asp Trp Tyr Ala Ala Val Thr Trp Pro Ala Val		
260	265	270
Glu Ala Pro Glu Thr Lys Arg Leu Ala Thr Ala Trp MET Asn Asn		
275	280	285
Trp Lys Tyr Ala Ala Arg Asn Val Pro Thr Asp Ala Ser Asp Gly		
290	295	300
Tyr Asn Gly Gln Asn Ser Ile Thr Arg Glu Leu Arg Leu Glu Arg		
305	310	315
Gln Ser Gly Gly Trp Tyr Thr Leu Leu Ser Thr Pro Val Pro Ala		
320	325	330
Leu Ser Asn Tyr Ala Thr Ser Ser Thr Thr Leu Pro Asp Arg Thr		
335	340	345
Val Asn Gly Ser Phe Val Leu Pro Trp Ser Gly Arg Ala Tyr Glu		
350	355	360
Leu Glu Leu Asp Ile Ser Trp Asp Thr Ala Ala Asn Val Gly Val		
365	370	375
Ser Val Gly Arg Ser Ser Asp Gly Ser Arg His Thr Asn Ile Gly		
380	385	390

19

20

⟨210⟩ 2

〈211〉 1467

⟨212⟩ DNA

〈213〉 Arthrobacter nicotinovorans

⟨400⟩ 2

⟨210⟩ 3

⟨211⟩ 517

⟨212⟩ PRT

〈213〉 Arthrobacter nicotinovorans

〈400〉 3

MET Thr Tyr Asp Ile Ser Arg Arg Thr Ala Leu Gln Gly Ala Gly

21

22

5	10	15
Val Gly Ala Leu Ala Leu Phe MET Ser Asn Ala Ile Pro Val Ala		
20	25	30
Ala His Ala Gln Ala Ser Leu Arg Ala Ile Tyr His MET Thr Pro		
35	40	45
Pro Ser Gly Trp Leu Cys Asp Pro Gln Arg Pro Val His Thr Asn		
50	55	60
Gly Ala Tyr Gln Leu Tyr Tyr Leu His Ser Gly Gln Asn Asn Gly		
65	70	75
Pro Gly Gly Trp Asp His Ala Thr Thr Gly Asp Gly Val Ser Tyr		
80	85	90
Thr His His Gly Val Val MET Pro MET Gln Pro Asp Phe Pro Val		
95	100	105
Trp Ser Gly Ser Ala Val Val Asp Thr Ala Asn Thr Ala Gly Phe		
110	115	120
Gly Ala Gly Ala Val Ile Ala Leu Ala Thr Gln Pro Thr Asp Gly		
125	130	135
Lys Phe Gln Glu Gln Tyr Leu Tyr Trp Ser Thr Asp Gly Gly Tyr		
140	145	150
Ser Phe Thr Ala Leu Pro Asp Pro Val Ile Val Asn Thr Asp Gly		
155	160	165
Arg Thr Ala Thr Thr Pro Ala Glu Val Glu Asn Ala Glu Trp Phe		
170	175	180
Arg Asp Pro Lys Ile His Trp Asp Ala Thr Arg Asn Glu Trp Val		
185	190	195
Cys Val Ile Gly Arg Ala Arg Tyr Ala Ala Phe Tyr Thr Ser Pro		
200	205	210
Asn Leu Arg Asp Trp Gln Trp Lys Ser Asn Phe Asp Tyr Pro Asn		
215	220	225
His Ala Leu Gly Gly Ile Glu Cys Pro Asp Leu Phe Glu MET Thr		
230	235	240
Ala Gly Asp Gly Thr Arg His Trp Val Phe Gly Ala Ser MET Asp		
245	250	255
Ala Tyr Ser Ile Gly Leu Pro MET Thr Phe Ala Tyr Trp Thr Gly		
260	265	270
Ser Trp Asn Gly Thr Ala Phe Ile Ala Asp Asn Leu Thr Pro Gln		
275	280	285
Trp Leu Asp Trp Gly Trp Asp Trp Tyr Ala Ala Val Thr Trp Pro		
290	295	300
Ala Val Glu Ala Pro Glu Thr Lys Arg Leu Ala Thr Ala Trp MET		
305	310	315
Asn Asn Trp Lys Tyr Ala Ala Arg Asn Val Pro Thr Asp Ala Ser		
320	325	330
Asp Gly Tyr Asn Gly Gln Asn Ser Ile Thr Arg Glu Leu Arg Leu		
335	340	345
Glu Arg Gln Ser Gly Gly Trp Tyr Thr Leu Leu Ser Thr Pro Val		
350	355	360
Pro Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Thr Ser Ser Thr Thr Leu Pro Asp		
365	370	375
Arg Thr Val Asn Gly Ser Phe Val Leu Pro Trp Ser Gly Arg Ala		

23

24

380	385	390
Tyr Glu Leu Glu Leu Asp Ile Ser Trp Asp Thr Ala Ala Asn Val		
395	400	405
Gly Val Ser Val Gly Arg Ser Ser Asp Gly Ser Arg His Thr Asn		
410	415	420
Ile Gly Lys Tyr Gly Asp Glu Leu Tyr Val Asp Arg Ala Ser Ser		
425	430	435
Glu Gln Ser Gly Tyr Ala Leu Ala Pro Tyr Thr Arg Ala Ala Ala		
440	445	450
Pro Ile Asp Ala Asn Ala Arg Ser Val His Leu Arg Ile Phe Val		
455	460	465
Asp Thr Gln Ser Val Glu Val Phe Val Asn Ser Gly His Thr Val		
470	475	480
Val Ser Gln Gln Val His Phe Ala Ala Gly Asp Thr Gly Ile Ser		
485	490	495
Leu Tyr Ala Asp Gly Gly Pro Ala Asn Phe Thr Gly Ile Thr Ile		
500	505	510
Arg Glu Phe Gly Asn Pro Ile		
	515	

<210> 4

<211> 1752

<212> DNA

<213> Arthrobacter nicotinovorans

<400> 4

ccggggacct	ttcccgacgg	tc	tcacacac	ccaicacccat	gacgttggc	gigtcgtcgc	60
gcccggcga	a	cactgagagg	aaacgaaatcg	atgacgtatcg	acatcttcg	ccgcactgccc	120
c	tc	caaggig	cagggttgg	tgcccttggca	citttcata	gcaatggccat	180
gcccacgccc	aggcataccct	ccgggcgatc	taccacatga	ccccggcc	gggttggctt	240	
tgtatccgc	agcgaccgt	acatacacaac	ggcccttacc	agcgttacta	ccicccatcc	300	
ggccagaaca	acggaccggg	cggttgggac	cacgcgatca	ccggcgacgg	agtgttttac	360	
accacca	tg	gatgggat	gccaatggca	ccggacttcc	ccgttgtggc	ggatcgcc	420
gtatgttggaca	ccggcaacac	cgccggcttc	ggccggcg	cgttca	tcgtccacc	480	
caacccaccc	acggaaaatt	ccaggaacag	tacccat	ggccacac	tggccgttac	540	
tccatcaccc	catggcttga	cccggttatt	gttacacttgc	atggacggac	ggccaccacc	600	
cccgccgagg	tggagaacgc	agaatgggtt	cgccgatccga	aaatttac	ggacgcgacg	660	
cgcaacgagt	gggcttgtt	catcgccagg	gcccgttac	ctggccatca	cacccttccc	720	
aacctgcggg	atggcaatgc	gaatggcaac	tgcgttacc	ccaaccacgc	ccgtccgggt	780	
atcgaaatgc	cggttgcgtt	cgaaatggacc	gcaggagacg	gaaccggca	ctgggtgtt	840	
ggggcgagca	tggacgcctt	cagcatggc	ttggccatga	cccttgcctt	cgttacatgt	900	
tcatggaaac	gcacagcatt	catcgccgac	aacccatcac	cacatggct	tgactgggaa	960	
tggacatgtt	acggccgtt	gaccgtggcc	gccgttggaa	cacccatgt	caagcggctt	1020	
gccacagcgt	ggttgcata	cggttgcata	cggttgcata	acgttgcac	ggacgcgtcc	1080	
gatggctata	acggccaaaa	ttccatcac	cgccgttca	ggcttgcgtt	ccaatcggtt	1140	
ggcttgcata	ccttgcgtt	cacggccgtt	ccggccgtt	cgttgcata	caccctcc	1200	
accacccttc	cggttgcac	agtcaacggc	agtttgcgtt	ttccgtggag	cggttgcgtt	1260	
tatgaacatgg	aatcgatata	ttcaatggac	acggcagcga	acgtgggat	cgttgcgtt	1320	
cgcttcgtcc	atggcagccg	ccatcgac	atcggttac	acggtgcac	ttgttacgtt	1380	
gatcgccat	cccggttgc	aagcggtt	ggttgcgtt	cctaccccg	cggttgcgtt	1440	
cccatcgat	cgatcgat	cgatcgat	ttgttacgtt	ttgttacgtt	ccaaatgtt	1500	
gagggttgcgtt	taatccgg	gcacacgg	ttgttacgtt	ttgttacgtt	cggttgcgtt	1560	

25

26

gacacgggga tctccctcta tgcggacggc ggtccggcca acttcaccgg catcaccatc 1620
 cgcgagttcg ggaacccat ctaagccigc gtcccacggc tggaaaggac gacggcgacg 1680
 ctgcagcagg cgggigcgic gcccgtttc ttccgggtcc gtgggcagt tcgcaictga 1740
 caaggcaccgg gg
 <210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <400> 5
 ccggccatat gcaggcatcc ctccggg
 <210> 6
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <400> 6
 gggacggatc cttagaiggg gtcccg

27

27

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るLFTaseのアミノ酸配列を示す。

【図2】本発明に係るLFTase遺伝子DNAの塩基配列を示す。

【図3】GS-9由来のLFTaseのアミノ酸配列を示す。

【図4】GS-9由来のLFTase遺伝子DNAの塩基配列を示す。

【図5】センスプライマーの塩基配列を示す。

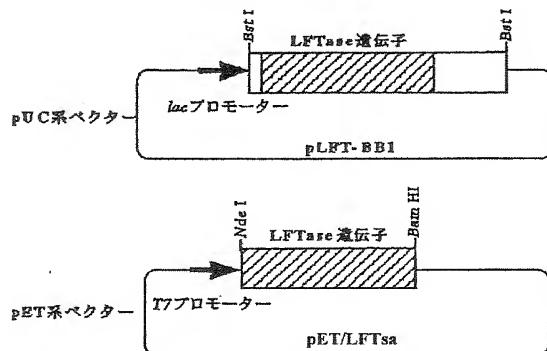
【図6】アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。

【図7】LFTaseの大量発現系の構築図である。

【図5】

センスプライマー
 5' - CCGCCCCATAT GCAGGCATCC CTCCGGG -3'

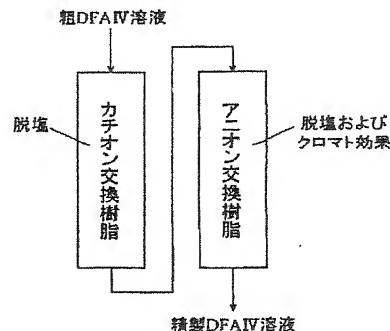
【図7】



【図6】

アンチセンスプライマー
 5' - GGGACGGATC CTTAGATGGG GTTCCCG -3'

【図11】



20

【図8】蔗糖からのDFA-IVの大量製造法のフローチャートを示す。

【図9】実施例1におけるSerratia levanicumのファーメンターによるレバパン合成を示す。なお、粘度は、B型粘度計 (No. 2回転軸、20℃) の実測値である。

【図10】DFA-IV含有液の脱塩前及び脱塩後のHPLCクロマトグラムである。

【図11】DFA-IVの精製図である。

【図12】粗DFA-IV溶液のHPLCクロマトグラムである。なお、縦軸はmV、横軸は保持時間(分)を表わす。

[図 1]

1
 21
 41 TYR His MET Thr Pro Pro Ser GLY Trp Leu Cys Asp Pro Glu Arg Pro Val His Thr Asn
 61 GLY Ala Tyr Gln Leu Tyr Tyr Leu His Ser GLY Gln Asn Asn GLY Pro GLY GLY Trp Asp
 81 His Ala Thr Thr GLY Asp GLY Val Ser Tyr Thr His GLY Val Val MET Pro MET Gln
 101 Pro Asp Phe Pro Val Trp Ser GLY Ser Ala Val Val Asp Thr Ala Asn Thr Ala GLY Phe
 121 GLY Ala GLY Ala Val Ile Ala Leu Ala Thr Gln Pro Thr Asp GLY Lys Phe Gln GLU Gln
 141 Tyr Leu Tyr Trp Ser Thr Asp GLY GLY GLY Tyr Ser Phe Thr Ala Leu Pro Asp Pro Val Ile
 161 Val Asn Thr Asp GLY Arg Thr Ala Thr Thr Pro Ala GLu Val GLu Asn Ala GLu Trp Phe
 181 Arg Asp Pro Lys Ile His Trp Asp Ala Thr Arg Asn GLu Trp Val Cys Val Ile GLY Arg
 201 Ala Arg Tyr Ala Ala Phe Tyr Thr Ser Pro Asn Leu Arg Asp Trp Gln Trp Lys Ser Asn
 221 Phe Asp Tyr Pro Asn His Ala Leu GLY GLY Ile GLU Cys Pro Asp Leu Phe GLU MET Thr
 241 Ala GLY Asp GLY Thr Arg His Trp Val Phe GLY GLY Asn Ser MET Asp Ala Tyr Ser Ile GLY
 261 Leu Pro MET Thr Phe Ala Tyr Trp Thr GLY Ser Trp Asn GLY Thr Ala Phe Ile Ala Asp
 281 Asn Leu Thr Pro Gln Asp Trp GLY Trp Asp Trp Tyr Ala Val Thr Trp Pro Val
 301 Ala Val GLU Ala Pro Gln Thr Lys Arg Leu Ala Thr Ala Trp MET Asn Asn Trp Lys Tyr
 321 Ala Ala Arg Asn Val Pro Thr Asp Ala Ser Asp GLY Tyr Asn GLY GLN Asn Ser Ile Thr
 341 Arg GLU Leu Arg Leu GLU Arg Gln Ser GLY GLY GLY Trp Tyr Thr Leu Leu Ser Thr Pro Val
 361 Pro Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Thr Ser Ser Thr Thr Leu Pro Asp Arg Thr Val Asn GLY
 381 Ser Phe Val Leu Pro Trp Ser GLY Arg Ala Tyr GLU Leu Asp Ile Ser Trp Asp
 401 Thr Ala Ala Asn Val Gln Val Gln Ser Arg Ser Asp GLY Ser Arg His Thr Asn
 421 Ile GLY Lys Tyr GLY Asp GLU Leu Tyr Val Asp Arg Ala Ser Ser GLU Gln Ser GLY Tyr
 441 Ala Leu Ala Pro Tyr Thr Arg Ala Ala Ala Pro Ile Asp Asn Asn Arg Ser Val His
 461 Leu Arg Ile Phe Val Asp Thr Gln Ser Val Phe Val GLU Val Asn Ser GLY His Thr Val
 481 Val Ser Gln Gln Val His Phe Ala Ala GLY Asp Thr GLY Ile Ser Leu Tyr Ala Asp GLY
 501 GLY Pro Ala Asn Phe Thr GLY Ile Thr Arg GLU Asn Pro Ile

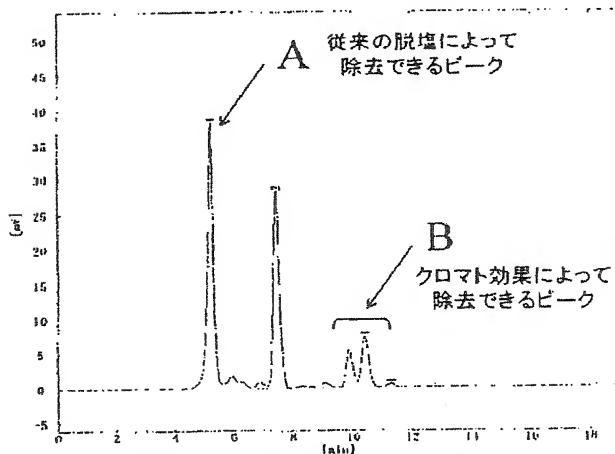
【図2】

Nde I

1 -----
 61 -----
 121 -----
 181 ---caTATG aggataact cggggcgata taccacatga acccggccca gggctggcta
 241 tgtgatccgc agggacccgt acatacaaac ggccgcatac agtctacta cctccactcc
 301 ggccagaaaca acggacccggg cggatgggac cccggacca cccggcgacgg agtgtttac
 361 accccaccatg gaggatgtat gccaatgca cccggacttc cccgtgtggta gggatcgaa
 421 gtagtggaca cccgcacac cccggcgctt ggcgcggcg cagtcatcgc gatcgccacc
 481 caacccaccc acggaaaatt ccaggaacacg taccttact ggtccaaagg tggcggtac
 541 tcattcaccc cattgcctga cccggtcatt gtgcacactg atggacccggac ggccaccacc
 601 cccggcgagg tggagaacgc agaatggttc cccggacccga zaattcactg ggaoggcgacg
 661 cgcacagggt ggggtgtgtgt cccggcgagg gcccgtacg ctgcgttata cacctatccc
 721 aacctggggg atggcaatg gaagtcacac ttcgactacc ccaaccacgc cccggcggt
 781 atcgaatgcc cggatctgtt cggaaatgacc gcaaggacg gaaaccggca ctgggtgtt
 841 gggcgagca tggacgccta cccggcgagg ttgcggatga ctttgcata ctggacaggt
 901 tcacatggaaacg gcacacgcatt cccggcgaccc gacactcacaac cacatgggt tgactgggga
 961 tggactgggt acggccgggt gacctggcccg gcccgtggaaacg cccctgagac caagaggctt
 1021 gcccacagggt gatgaaacaa ctggaaatata gcccggca acgtgcggccac ggacgcgtcc
 1081 gatggotata acggggcaaaa ttccatcactg cccggcggtt cccggcgatcc gatcgaccc
 1141 ggctggtaa ctttgcatacg cccggcggtt cccggcgatcc gatcgaccc
 1201 accaccccttc cggacccggac agtcaacggg gatggacttgc ttcgggtggag cggccggcg
 1261 tatgaaactgg aactcgatata ttccatgggac cccggcgaccc acgtggggagt atcggtggga
 1321 cgcgtgtcgc atggcggcccg cccggcgaccc acgtggggagt atcggtggga gttgtacgtc
 1381 gatcgccat cccggcgaccc acgtggggagt atcggtggga gatcgccatcc ttcgggtggag
 1441 cccatcgatg cccggcgaccc acgtggggagt atcggtggga gatcgccatcc ttcgggtggag
 1501 gaggtgttcg taatccgg gatcgaccc acgtggggagt atcggtggga gatcgccatcc ttcgggtggag
 1561 gacacgggggatccat cccggcgaccc acgtggggagt atcggtggga gatcgccatcc ttcgggtggag
 1621 cccggcgaccc acgtggggagt atcggtggga gatcgccatcc ttcgggtggag
 1681 -----
 1741 -----

Bam HI

【図12】



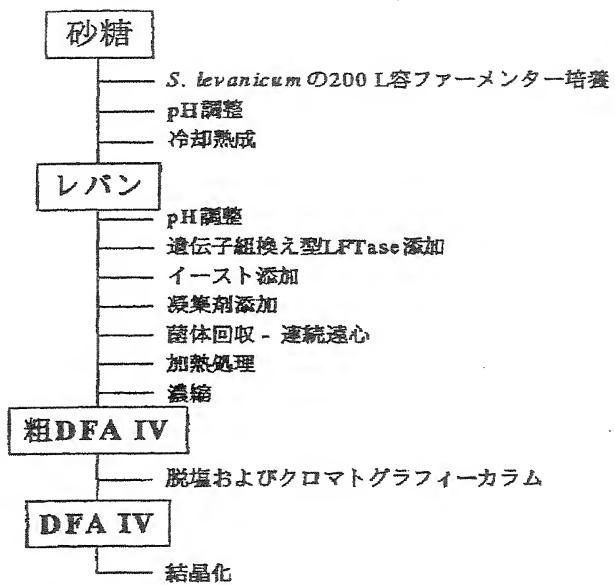
【図3】

1 MET Thr Tyr Asp Ile Ser Arg Arg Thr Ala Leu Gln Gly Ala Gly Val Gln Gly Ala Leu Ala
 21 Leu Phe MET Ser Asn Ala Ile Pro Val Ala Ala His Ala Gln Ala Ser Leu Arg Ala Ile
 41 Tyr His MET Thr Pro Pro Ser Gly Trp Leu Cys Asp Pro Gln Arg Pro Val His Thr Asn
 61 GLY Ala Tyr Gln Leu Tyr Tyr Leu His Ser Gly Gln Asn Asn Gln Pro Gly Gly Trp Asp
 81 His Ala Thr Thr Gly Asp Gly Val Ser Tyr Thr His His Gly Val Val Met Pro Met Gln
 101 Pro Asp Phe Pro Val Trp Ser Gly Ser Ala Val Val Asp Thr Ala Asn Thr Ala Gly Phe
 121 GLY Ala GLY Ala Val Ile Ala Leu Ala Thr Gln Pro Thr Asp Gly Lys Phe Gln Gln Gln
 141 Tyr Leu Tyr Trp Ser Thr Asp Gly GLY Tyr Ser Phe Thr Ala Leu Pro Asp Pro Val Ile
 161 Val Asn Thr Asp Gly Arg Thr Ala Thr Thr Pro Ala Gln Val Gln Asn Ala Gln Trp Phe
 181 Arg Asp Pro Lys Ile His Trp Asp Ala Thr Arg Asn Gln Trp Val Cys Val Ile GLY Arg
 201 Ala Arg Tyr Ala Ala Phe Tyr Thr Ser Pro Asn Leu Arg Asp Trp Gln Trp Lys Ser Asn
 221 Phe Asp Tyr Pro Asn His Ala Ile Gln GLY Ile Gln Cys Pro Asp Leu Phe Gln MET Thr
 241 Ala GLY Asp GLY Thr Arg His Trp Val Phe GLY Ala Ser MET Asp Ala Tyr Ser Ile GLY
 261 Leu Pro MET Thr Phe Ala Tyr Trp Thr GLY Ser Trp Asn GLY Thr Ala Phe Ile Ala Asp
 281 Asn Leu Thr Pro Gln Trp Leu Asp Trp GLY Trp Asp Trp Tyr Ala Ala Val Thr Trp Pro
 301 Ala Val Glu Ala Pro Glu Thr Lys Arg Leu Ala Thr Ala Trp MET Asn Asn Trp Lys Tyr
 321 Ala Ala Arg Asn Val Pro Thr Asp Ala Ser Asp GLY GLY Tyr Asn Gln Asn Ser Ile Thr
 341 Arg Glu Leu Arg Leu Gln Arg Gln Ser Gly GLY Trp Tyr Thr Leu Leu Ser Thr Pro Val
 361 Pro Ala Leu Ser Asn Tyr Ala Thr Ser Ser Thr Leu Pro Asp Arg Thr Val Asn Gln GLY
 381 Ser Phe Val Leu Pro Trp Ser GLY Arg Ala Tyr Gln Leu Asp Ile Ser Trp Asp
 401 Thr Ala Asn Val GLY Val Ser Val GLY Arg Ser Ser Arg His Thr Asn
 421 Ile GLY Lys Tyr GLY Asp Gln Leu Tyr Val Asp Arg Ala Ser Ser Gln Gln Ser GLY GLY
 441 Ala Leu Ala Pro Tyr Thr Arg Ala Ala Ala Pro Ile Asp Ala Asn Ala Arg Ser Val His
 461 Leu Arg Ile Phe Val Asp Thr Gln Ser Val Gln Val Phe Val Asn Ser GLY His Thr Val
 481 Val Ser Gln Gln Val His Phe Ala GLY Asp Thr GLY Ile Ser Leu Tyr Ala Asp GLY
 501 GLY Pro Ala Asn Phe Thr GLY Ile Thr Ile Arg Gln Phe GLY Asn Pro Ile

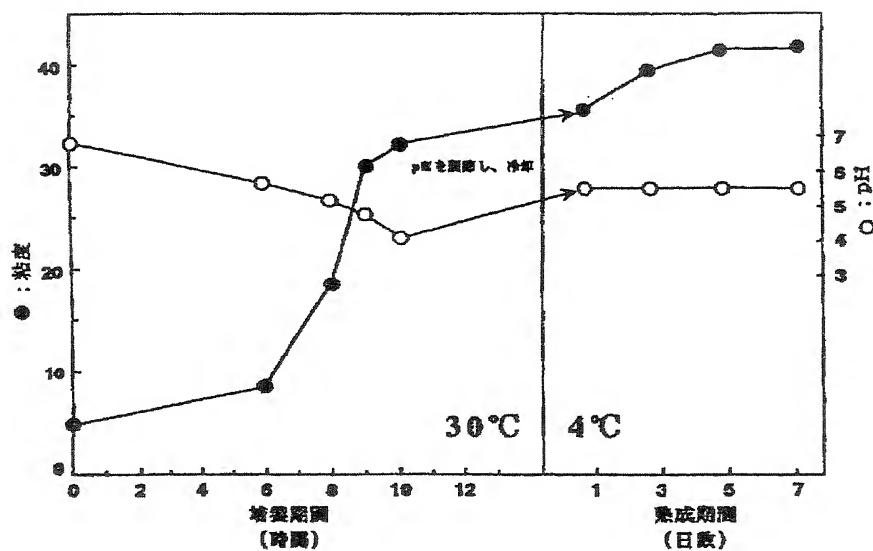
【図4】

1 cccgggacct ttccccgacgg tctcacacacccatcaccat gacgtttgcg gtgtcgatgc
 61 gcccggaa cactgagagg aaaaaatcg atgacgtatg acatctctatc cccgactgac
 121 ctgcaagggtg cagggggttgg tgccttggca cttttcatga gcaatgcacat tcccggtggcc
 181 gccccggcc aggcatccat ccggcgatc taccacatga ccccgccatc gggctggct
 241 tgtgatccgc agggacccgt acatacaac ggacccatc agctctacta cctccactcc
 301 ggccagaaca acggaccggg cggatggac cccggcgatc cccggcgacgg agtgtcttac
 361 aaccacccatg gagtggtgat gccaatgoaa ccggacttcc cccggatggc gggatggaa
 421 gtagtggaca cccggccatc cccgggttcc cccggccatc gctggccacc
 481 caacccacccg acggaaaatt ccaggaaacag tacctttat gttccacggg tggcggttac
 541 tccttcacccg cattggctga cccgggttcc gttccacactg atggacggac ggcacccac
 601 cccggccgggg tggagaacgc aaaaatgggttcc cccggccatc aatttactg ggacggacgg
 661 cgcacacgagt gggctgtgt catggcagg gcccgcatac cccggccatc cccggccatc
 721 aaccatgggg attggcaatg gaagttccac tccggacttcc cccggccatc cccggccatc
 781 atcgaatgcc cggatctgtt cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 841 gggggcggcga tggacgctt cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 901 tcatggaaacg gcaacacat cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 961 tgggacttgtt cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1021 gccccacggtt cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1081 gatggctata cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1141 ggcgtgttaca cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1201 accacccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1261 tatgaactgg aactcgatata tccatggac cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1321 cccatcgatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1381 gatggatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1441 cccatcgatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1501 gaggtgttcc taaattccgg cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1561 gacacgggggat cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1621 cccggatccgg gggatccat cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1681 ctggcggcagg cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc cccggccatc
 1741 caacccacccg gg

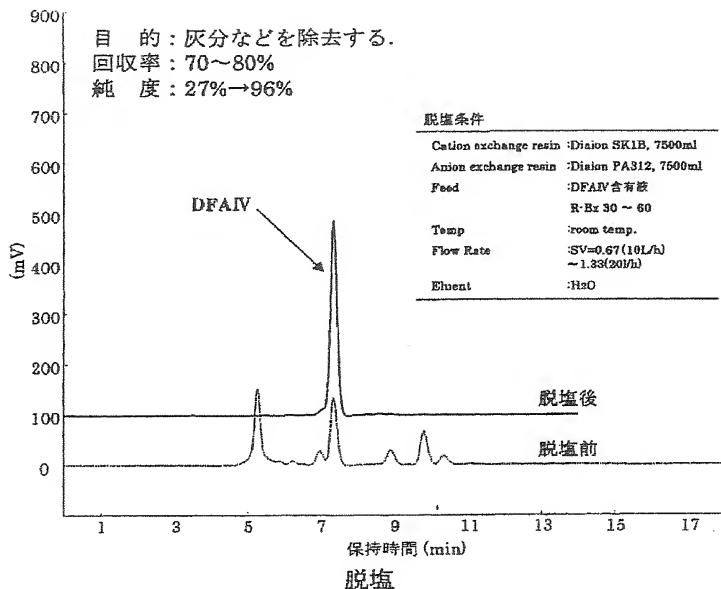
【図8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード(参考)
(C 1 2 N 9/10		C 1 2 R 1:19)	
C 1 2 R 1:19)		1:06)	
(C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 R 1:06)		C 1 2 R 1:06)	
(72)発明者 櫻井 博章		(72)発明者 浅野 行蔵	
北海道帯広市稻田町南9線西13番地 日本		北海道札幌市北区北9条西9丁目 北海道	
甜菜製糖株式会社総合研究所内		大学農学部内	
(72)発明者 佐山 晃司		(72)発明者 横田 篤	
北海道帯広市稻田町南9線西13番地 日本		北海道札幌市北区北9条西9丁目 北海道	
甜菜製糖株式会社総合研究所内		大学農学部内	
(72)発明者 有塙 勉		F ターム(参考) 4B024 AA05 BA80 CA04 DA06 GA11	
北海道帯広市稻田町南9線西13番地 日本		GA19 HA01	
甜菜製糖株式会社総合研究所内		4B050 CC01 CC03 DD02 LL02	
(72)発明者 富田 房男		4B064 AF03 CA19 CB07 CC24 CD19	
北海道札幌市北区北9条西9丁目 北海道		CE10 CE11 DA10	
大学農学部内			